

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ЭТАП СЕЛЕКЦИИ РИСА (обзор)

П.И. Костылев

Всероссийский НИИ зерновых культур им. И. Г. Калининко

Для увеличения объемов производства риса необходимо использовать сорта с более высокой урожайностью и устойчивостью к стресс-факторам. Последние достижения в биотехнологии риса повышают эффективность селекции. Расширение генофонда культурного риса производится за счет диких родственников и новых методов, таких как культивирование зародышей, слияние протопластов, соматональные вариации и геновая инженерия. Молекулярные методы были использованы для точного контроля интрогрессии чужеродных генов с помощью молекулярных маркеров. Геновая инженерия позволяет перенести чужеродные гены от бактерий, вирусов, грибов, животных и растений в культивируемые виды. Трансгенный рис имеет повышенный потенциал урожайности, устойчивость к насекомым, болезням, абиотическим стрессам, улучшенные пищевые качества.

Рис является наиболее важной продовольственной культурой и продуктом питания для 40% населения планеты. Свыше 90% риса производится и потребляется в Азии. Он выращивается в самых разных агроклиматических условиях. Крупные успехи в увеличении производства риса во всем мире произошли благодаря крупномасштабному применению современных высокоурожайных сортов риса и улучшению технологий выращивания.

Мировое производство риса более чем удвоилось – с 257 млн т в 1966 году до 599 млн т в 2000 году. Этого удалось добиться за счет применения принципов классической генетики Менделя и традиционных методов селекции растений. Нынешнее население планеты с 6,1 млрд, как ожидается, достигнет 8,0 млрд человек к 2030 году и поэтому необходимо увеличить производство риса на 50%, чтобы удовлетворить растущий спрос.

Чтобы эта цель была достигнута, необходимо использовать сорта риса с более высокой потенциальной урожайностью, устойчивостью

к болезням и вредителям и толерантностью к абиотическим стрессам.

Селекция растений состоит из двух этапов:

- эволюционный этап, когда создаются разнообразные популяции;
- оценочный этап, когда отбираются родоначальные генотипы.

Последние достижения в области клеточной и молекулярной биологии, биотехнологии риса разработали новые инструменты для повышения эффективности обеих фаз [1].

Эволюционный этап характеризуется расширением генофонда культурных сортов риса. Генетическая изменчивость агрономических признаков является ключевым компонентом программы селекции для расширения генофонда риса и других культур. Большое количество сортов риса и элитных селекционных линий, характеризующихся устойчивостью к болезням и вредителям, толерантностью в отношении абиотических стрессов и улучшенными качественными характеристиками, было выведено с помощью обычных методов селекции. В таких селекционных программах была использована в основном генетическая изменчивость зародышевой плазмы *O. sativa*. Однако генетическая изменчивость многих признаков, как, например, толерантность к желтой стеблевой огневке, вирусу тунгро, ризоктониозу и солевому стрессу ограничена у культурного риса. Поэтому селекционеры ведут поиск генетической изменчивости в других генных пулах с участием диких родственников *O. sativa* и новых методов, которые применяются для создания и передачи изменений посредством соматональных вариаций и геновой инженерии.

Отдаленная гибридизация. Отдаленной является гибридизация между культурным рисом и дикими видами для расширения генофонда сортов. Род *Oryza* включает 24 вида с геномами: AA, BB, CC BBCC, CCDD, EE, FF, GG, HHJJ и HHKK. Из этих видов *O. sativa* (2n

= 24, AA) культивируется во всем мире, тогда как *O. glaberrima* ($2n = 24$, AA) ограниченно выращивается в некоторых районах Западной Африки. Дикие виды являются важным источником полезных генов устойчивости к болезням и вредителям, толерантности к абиотическим стрессам и цитоплазматической мужской стерильности. Однако при передаче полезных генов от диких видов в культурный рис возникают некоторые проблемы. Наиболее часто встречается барьер отсутствия скрещиваемости в результате хромосомных и генетических различий. Биотехнологические методы, такие, как культивирование зародышей и слияние протопластов, которые были использованы для преодоления этих трудностей, позволили получить несколько межвидовых гибридов. Молекулярные методы были использованы для точного контроля интрогрессии чужеродных генов.

Перенос генов от дикорастущих видов риса. Гибриды между культурным рисом и дикими видами с геномом AA могут быть получены посредством использования обычных процедур. Гибриды между рисом и отдаленными дикими видами, с другой стороны, как правило, трудно получить; наблюдается низкая скрещиваемость и недоразвитие гибридных зародышей. Гибриды между элитными селекционными сортами и образцами диких видов, представленными геномами BBCC, CC, CCDD, EE, FF, GG, HHJJ и HHKK, получают путем культивирования зародышей. Несколько полезных генов устойчивости к бурой дельфациде, белоспинной дельфациде, бактериальному увяданию, пирикулярриозу и болезни тунгро были перенесены из дикорастущих видов в культурный рис [2].

Первый пример передачи полезных генов от диких видов – это интрогрессия генов устойчивости к вирусу травянистой карликовости (ВТК) от *O. nivara* в культурный рис [3]. Сорта, устойчивые к ВТК (IR 28, IR 29 и IR 30), были выведены в 1974 году. Позже были созданы другие устойчивые к ВТК сорта (IR 32, IR 34 и IR 36). Ген устойчивости к ВТК в настоящее время включен в многочисленные сорта, выведенные в Международном НИИ риса (IRRI) или в рамках национальных программ по рису.

Цитоплазматические различия. Дикие виды с геномом AA были важным источником цитоплазматической мужской стерильности

(ЦМС), которая используется для селекции коммерческих гибридов риса. Lin и Yuan (1980) сообщили о создании мужских стерильной линии с цитоплазмой от дикого вида (*O. sativa* f. *spontanea*) и ядерным геномом культурного риса [4]. Около 95% ЦМС-линий, используемых в коммерческих гибридах риса, выращиваемых в Китае и других странах, имеют цитоплазму типа WA. Новый источник ЦМС из *O. perennis* был перенесен в рис подвита *indica*. Недавно созданная ЦМС-линия IR 66707A имеет цитоплазму *O. perennis* и геном культурного риса IR 64. Генетические исследования показывают, что источник мужской стерильности IR 66707A отличается от WA. Была также получена другая линия ЦМС (IR 69700A) с цитоплазмой *O. glumaepatula* и геномом IR 64. Обе линии были абсолютно стабильными по мужской стерильности.

Контроль чужеродных генов с помощью молекулярных маркеров. Чужеродные гены устойчивости к дельфациде, бактериальному увяданию и пирикулярриозу были помечены молекулярными маркерами. RELP-анализ линий, полученных от гибрида *O. sativa* x *O. officinalis*, показал интрогрессии сегментов 11-й и 12-й хромосом от *O. officinalis* [5]. У линии IR 65482-4-136-2-2 проводили RELP-анализ генов устойчивости к трем биотипам дельфациды, полученных в результате гибридизации *O. sativa* x *O. australiensis*. Из 14 ранее подключенных зондов для хромосомы 12, только молекулярный маркер RG457 обнаружил интрогрессию от *O. australiensis*, т.е. был сцеплен с геном устойчивости. Такие жесткие связи должны облегчить селекцию на устойчивость к дельфациде при передаче гена другим селекционным линиям риса.

Соматоклональные вариации. Соматоклональные вариации касаются изменений, возникающих на основе тканевых культур при регенерации растений. Соматоклональные вариации происходят у различных видов растений по таким агрономическим признакам, как устойчивость к болезням, высота растений, количество побегов и время созревания, а также по различным биохимическим признакам. Метод заключается в выращивании каллуса или клеточной культуры на протяжении нескольких циклов и регенерации растений из этих долгосрочных культур. Регенерацию растений и их потомков проводили в целях выявления форм с новыми фенотипами. Были вы-

делены некоторые полезные соматональные варианты, в том числе устойчивые к болезням и с мужской стерильностью. В Венгрии получено несколько соматональных вариантов, один из которых был зарегистрирован как сорт *Dama*: он устойчив к пирикуляррии и имеет хорошее качество крупы [6].

Генная инженерия. Интродукция чужеродных генов от бактерий, вирусов, грибов, животных и, конечно, от неродственных растений в культивируемые виды позволяет селекционерам достичь таких целей, которые еще десять лет назад были невозможными. В настоящее время имеются несколько методов для трансформации риса, например: электропорация, полиэтиленгликоль-индуцированное поглощение ДНК в протопластах, бомбардировка микроснарядами, а в последнее время и трансформация с помощью *Agrobacterium*. Трансгенный рис с агрономически важными генами устойчивости к стеблевому пилильщику и грибковым инфекциям, а также толерантности к гербицидам был получен в обоих подвидах: *japonica* и *indica*. Несколько лабораторий разработали трансгенный рис в основном средствами трансформации ДНК протопластов, а также через микробомбардировки.

Трансгенный рис для изменения потенциала урожайности. Биосинтез крахмала играет важную роль в метаболизме растений. Он включает в себя несколько ферментативных этапов. АДП – глюкозо-пирофосфорилаза является критическим ферментом для регуляции биосинтеза крахмала в тканях растений. Уровень крахмала и накопление сухого вещества были улучшены в клубнях картофеля, который был преобразован с помощью генов *glg C16* от *E. coli*, кодирующих этот фермент [7]. Ген *glg C16* был введен в рис и его урожайность повысилась.

Передача признаков С4 фотосинтеза в С3 рис изучается с целью повышения его эффективности. Однако очень трудно передать гены признаков С4 в растения С3 с помощью традиционных методов селекции растений. Ку и др. (1999) с помощью агробактериальной трансформации перенесли из кукурузы ген фосфоенолпируват карбоксилазы (РЕРС), которая стимулирует первоначальную фиксацию атмосферного CO_2 в растениях С4. Большинство трансгенных растений риса показали высокий уровень экспрессии гена кукурузы; активность РЕРС в листьях некоторых трансген-

ных растений была в два-три раза выше, чем в кукурузе, а доля фермента составляла до 12% от общего растворимого белка листьев [8]. Эти результаты демонстрируют успешные стратегии внедрения ключевых компонентов биохимических путей С4 фотосинтеза в рис.

Трансгенный рис, устойчивый к насекомым. Еще в начале 1987 года генный код токсина *Bacillus thuringiensis* (Bt) был передан в геном помидора, табака и картофеля, где он обеспечивает защиту от чешуекрылых насекомых. Главная цель – создание Bt трансгенного риса, устойчивого к желтому стеблевому пилильщику (*Scirpophaga incertulas*). Вредитель очень широко распространен в Азии и является причиной значительных потерь урожая. Лучшие сорта риса являются уязвимыми для насекомых или имеют лишь умеренный уровень резистентности. Поэтому трансгенный рис с Bt-геном весьма перспективен для борьбы с желтым стеблевым пилильщиком.

Трансгенный рис, устойчивый к болезням. Источники устойчивости к ряду заболеваний (пирикулярриоз и бактериальное увядание) были выявлены в культивируемых сортах риса. Однако источников устойчивости к ризоктониозу нет, есть только несколько известных доноров резистентности к болезни Тунгро (два типа вируса). Очень успешная стратегия защиты, известная как слой белка (СР), давно используется против некоторых вирусных заболеваний, например вируса табачной мозаики у табака и томата. Ген СР был введен в два сорта риса подвида *japonica*, неустойчивого к вирусу штриховатости, с помощью электропорации протопластов [9]. Полученные трансгенные растения имеют высокий уровень СР (до 0,5% от общего растворимого белка), а также показывают высокий уровень резистентности к вирусной инфекции. Устойчивость была унаследована потомками.

Zhang и др. (1998) ввели ген *Xa21* с помощью бомбардировки микрочастицами в клеточные суспензии сортов риса индика: IR-64, IR-72 и др. Шесть из 55 линий с перенесенным геном показали высокий уровень устойчивости к бактериальному увяданию в последующих поколениях [10]. Ризоктониоз риса вызывается грибом *Rhizoctonia solani*, который имеет широкий круг хозяев. У риса были выявлены шесть генов хитиназы, которые в настоящее время используются для повышения уровня резистентности к грибковым заболева-

ниям. Посредством трансформации полиэтиленгликолем в генотип риса ввели ДНК, содержащую ген хитиназы.

Трансгенный рис, толерантный к абиотическим стрессам. Различные абиотические стрессы, такие как засуха, избыток воды, токсичность, дефицит минералов в почве и неблагоприятные температуры, влияют на продуктивность риса. Методы генной инженерии открывают огромные перспективы для создания сортов риса с более высоким уровнем толерантности к абиотическим стрессам.

Sakamoto и Murata (1998) ввели ген холинксидазы *codA* из *Arthrobacter globiformis*. Ген *codA* наследовался во втором поколении трансгенного риса и его выражение устойчиво поддерживалось на уровне м-РНК, белков и ферментативной активности. Предварительные результаты показали, что трансгенные растения восстановились лучше контрольных растений после воздействия 0,15 М NaCl в течение 7 дней. Дальнейший анализ трансгенных растений продемонстрировал их способность синтезировать бетаин и обеспечивать большую устойчивость к солям и холоду [11].

Трансгенный рис с улучшенными пищевыми качествами. Рис не содержит ни β -каротина (провитамина А), ни каротиноида С40 в эндосперме. Рис в виде шлифованной крупы (как он обычно потребляется) совсем не имеет витамина А и его предшественника – каротиноида. Миллионы потребителей, которые зависят от риса, страдают от недостатка витамина А. Ye и др. (2000) создали трансгенный рис (Золотой рис) с биосинтезом провитамина А (β -каротин) в его эндосперме путем генной инженерии [12]. Трансформация посредством *Agrobacterium* применялась для введения трех генов: фитоин синтазы (*psv*), фитоин дезацетилазы (*crt1*) и ликопин каротина (*lcy*). Хроматографический анализ показал присутствие β -каротина в трансгенных семенах. Преобразованный рис Taipei 309 еще не культивируется. В настоящее время в IRRI осуществляется передача генов β -каротина в широко выращиваемые сорта, такие как IR 64, посредством обычных беккроссов и трансформаций.

Goto и др. (1999) перенесли всю кодирующую последовательность гена ферритина от сои в сорта риса с помощью *Agrobacterium* трансформации. Синтез соевого белка ферритина был подтвержден в каждом из семян

трансформированного риса с помощью иммунологического анализа тканей. Содержание железа в семенах линии T1 было в три раза выше, чем у нетрансформированной формы [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Khush, G. S. & Brar, D.S. 1998. The application of biotechnology to rice. In Ives, C. & Bedford, B. eds. *Agricultural biotechnology in international development*, p. 92–121. Wallingford, UK, CAB International.
2. Jena, K.K. & Khush, G.S. 1990. Introgression of genes from *Oryza officinalis* Well ex Watt to cultivated rice, *O. sativa* L. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 737–745.
3. Khush, G.S. 1977. Disease and insect resistance in rice. *Adv. Agron.*, 29: 265–341.
4. Lin, S.C. & Yuan, L.P. 1980. Hybrid rice breeding in China. In *Innovative approaches to rice breeding*, p.35–51. Manila, Philippines, IRRI.
5. Jena, K.K., Khush, G.S. & Kochert, G. 1992. RFLP analysis of rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 608–616.
6. Heszky, L.E. & Simon-Kiss, I. 1992. “DAMA” the first plant variety of biotechnology origin in Hungary, registered in 1992. *Hung. Agric. Res.*, 1: 30–32.
7. Stark, D.M., Timmerman, K.P., Bary, G.F., Priess, J. & Kishore, G.M. 1992. Regulation of the amount of starch in plant tissue by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science*, 285: 287–292.
8. Ku, S.B., Agarie, S., Normura, M., Fukayama, H., Tsuchida, H., Ono, K., Hirose, S., Toki, S., Miyao, M. & Matsuoka, M. 1999. High level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nature Biotechnology*, 17: 76–80.
9. Hayakawa, T., Zhu, Y., Itoh, K. & Kimura, Y. 1992. Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 9865–9869.
10. Zhang, S., Song, W-Y., Chen, L., Ruan, D., Taylor, N., Ronald, P., Beachy, R. & Fauquet, C. 1998. Transgenic elite indica rice varieties resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Breed.*, 4: 551–558.
11. Sakamoto, A. & Murata, N. 1998. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycine betaine and tolerance to environmental stress. In *Intern. Workshop on Breeding and Biotechnology for Environmental Stress in Rice*, p. 164–165. Sapporo, Japan.
12. Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, A., Lucca, P., Beyer, P. & Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin A (b-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free)rice endosperm. *Science*, 287:303–305.
13. Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S. & Takaiwa, F. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology*, 17: 282–286.